中國醫藥學院研究年報
China Medical College
Annual Bulletin
Vol. 15 (1989)

獨活粗抽取物對中樞神經系統作用之研究

蔡輝彥　陳玉芳　吳天賞**　謝明村*　賴貞秀**
中國醫藥學院　藥理學科　中國藥學研究所*
靜宜女子文理學院　應用化學研究所**

本研究乃探討獨活以甲醇、氯仿、乙酸乙酯等有機溶媒抽取，將抽取物進行與中樞神經系統有關之各項實驗，獲得結果如下：

1. 獨活以口服方式給藥在小白鼠之半數致死量(LD50)爲甲醇粗抽取液3.9g/kg(3.15－4.84 g/kg)；氯仿層0.85g/kg(0.75－0.95g/kg)而水層則大於64.2g/kg。
2. 獨活之甲醇粗抽取液、氯仿層及乙酸乙酯層對熱刺激及化學刺激所引起的痛有鎮痛作用，而水層則無明顯鎮痛效果。
3. 獨活之甲醇粗抽取液、氯仿層及乙酸乙酯層能縮短由hexobarbital 誘發睡眠的發作時間，並能延長其睡眠時間。
4. 獨活之氯仿層及乙酸乙酯層對strychnine及picrotoxin 所引起痙攣有拮抗作用，但無法拮抗由pentylenetetrazol所引起之痙攣；獨活之甲醇粗抽取液能拮抗由picrotoxin所引起之痙攣，對strychnine及pentylenetetrazol 所引起之痙攣則無拮抗作用。
5. 獨活之甲醇粗抽取液可抑制由carrageenin 引起之發炎；而氯仿層及乙酸乙酯層對formalin及carrageenin引起之發炎有抑制作用。

由以上結果顯示獨活具有鎮痛、鎮靜、抗痙攣及抗發炎等作用，與歷代本草中記載能祛風、勝濕、散寒、止痛而治風寒濕痺，腰膝酸痛，手脚攣痛等有相同之處。

前　言

獨活被收錄於神農本草經草部上品，爲常用中藥之一，是繖形科（Umbelliferae）植物毛當歸（*Angelica pubescens* Maxim.），其藥用部分爲根及根莖。獨活在本草中記載爲：治本經傷風、頭痛、頭暈、目眩、風熱齒痛、痙癎濕痺，奔豚疝瘕等。亦即獨活具有祛風、勝濕、散寒、止痛等功效，在臨床上常使用於治療風濕症及鎮痛等方面。

有關獨活之現代藥理文獻很少，只有Kosuge 等人，於1985年曾報告獨活之甲醇粗抽取液具有抗炎及鎮痛效果[1]，又其ethyl acetate elute 亦具有抗炎及鎮痛效果，並推測其有

效成分可能是Osthol[2]。而國立中國醫藥研究所陳介甫所長（前國立陽明醫學院藥理研究所所長）曾研究指出獨活之粗抽取液可降低小白鼠之自發運動量(locomotor activity)，並能延長小白鼠之睡眠時間，顯示獨活確實對中樞神經系統有影響；本研究乃針對獨活以不同有機溶媒（如甲醇、氯仿、乙酸乙酯等）抽取，以其抽取物進行各項有關中樞神經系統之作用，以了解獨活之藥理作用。

材料與方法

一、藥材製備與試驗

獨活藥材係購自台中市協隆中藥行，經生藥學者鑑定並確認其基原，以磨粉機研成粗粉，加入足量甲醇抽取，得甲醇粗抽取液，冷却後可得大量結晶（多爲醣類）及濾液，濾液經濃縮，並以水飽和的氯仿加以分離(Partition)，得到氯仿層及水層，水層部分再以乙酸乙酯來萃取，又得乙酸乙酯層及水層（如圖一所示）。獨活之甲醇粗抽取液、氯仿層、水層及乙酸乙酯層以眞空濃縮機(Rotary Vaccum Evaporator) 減壓濃縮之，濃縮至黏稠性藥品。臨用前以適量Tween 60研勻後，加生理食鹽水配製成所需濃度，以胃管口服給予實驗動物（大白鼠—SD系雄性，小白鼠—ICR系雄性）。

本實驗在藥理部分使用之化學藥品，以下爲Sigma產品：serotonin、indomethacin、hexobarbital、strychnine nitrate、picrotoxin hydrochloride、pentyleneterazol。而formalin和acetic acid則爲Osaka產品。

二、急性毒性試驗

本實驗使用體重18～25公克之ICR雄性小白鼠，測定獨活由口服給予後，連續觀察72小時，並記錄其死亡情形。依Litchfield and Wilcoxon方法[3]，求得可使實驗動物一半死亡之劑量及其95%可信限，以作爲下列各項實驗用藥劑量之指標。

三、鎮痛試驗

(1)熱板法：使用體重18～25公克之雄性小白鼠，將小白鼠置於Hot plate Analgesy Meter之熱板上，固定其溫度（55±0.5℃）。實驗前，首先測出給藥前之反應時間(reaction time)，經5分鐘後，再測之，二次反應時間差在5秒以內者篩選做此項實驗。獨活之甲醇粗抽液、氯仿層、乙酸乙酯層、水層等以0.1g/kg(P.O.)給藥30分鐘後，將小白鼠置於上述熱板上，測定其開始有痛的反應所需時間，其判讀標準爲舔後脚，縮後肢或跳躍等[4]。對照組則給生理食鹽水。

(2)醋酸法：使用體重18～25公克之雄性小白鼠，由腹腔注射1.0% Acetic acid (0.1ml/10g)，觀察並記錄小白鼠注射醋酸5分鐘後在10分鐘內之重複肌肉收縮及所伴隨之後肢伸張次數(writhing response)[5]。獨活之甲醇粗抽取液、水層、氯仿層和乙酸乙酯層0.1g/kg(P.O) 投藥1小時後，再由腹腔注射acetic acid，觀察並記錄小白鼠後肢伸張次數，與對照組比較之，對照組則給生理食鹽水。

四、對睡眠時間之影響

獨活之甲醇粗抽取液、氯仿層及乙酸乙酯層0.1g/kg（P.O.）給藥1小時後，由腹腔注射hexobarbital（100mg/kg）以誘發睡眠。觀察並記錄從注射hexobarbital後至小白鼠之翻正反射(righting reflex)消失的時間(onset)及翻正反射消失至恢復時間(sleeping time)[6]，對照組給0.5%CMC。

五、對中樞神經興奮劑引起痙攣之影響

獨活之甲醇粗抽取液、氯仿層及乙酸乙酯層0.1g/kg(P.O.)給藥1小時後，再給各種中樞神經興奮劑：pentylenetetrazol(120mg/kg ,I.P.)、strychnine nitrate (2mg/kg I.P.)、picrotoxin (10mg/kg S.C.)觀察並記錄誘發小白鼠產生陣發性痙攣(clonic convulsion)的時間及由陣發性痙攣至強直性痙攣(tonic convulsion)而死亡的時間[7]。對照組則給生理食鹽水。

六、對化學物質所致炎症之影響

選取130～160公克之雄性大白鼠，每組六隻，分別給獨活之甲醇粗抽取液、氯仿層、乙酸乙酯層0.1g/kg(P.O.)，給藥半小時後，由大白鼠之右後足蹠處皮下注射formalin(3%)、carrageenin (1.5%)或serotonin (0.1%)等[8]，以右後足蹠浮腫爲指標，每半小時測其右後肢之排水量（以Plethysometer，Ugo Basile測之）以了解其浮腫情形。對照組則給予生理食鹽水10ml/kg，另一組則給 indomethacin 4mg/kg作爲比較組，以評估獨活與indomethacin效價之間的關係。

$$\text{浮腫率 (Edema rate)} = \frac{Bn-A}{A} \times 100$$

A：第一次control之實排水量

B_1：注射後第一次測得之排水量

B_2：注射後第二次測得之排水量

七、統計學分析

除特別標明者外，本研究所有結果的數據，皆以unpaired Students' t-test方法分析其間差異的顯著性。P值大於0.05時則認爲其差異無統計上之意義。

結　果

一、急性毒性試驗

小白鼠經由胃管口服給予獨活後，初期僅有活動量抑制，劑量加大時並無明顯之行爲改變。

如表一所示，獨活之水層其毒性最低（＞64.2g/kg）而氯仿層之毒性最大(0.845g/kg)，甲醇粗抽取液之毒性則介於二者之間；至於乙酸乙酯層則因抽取所得產率太少，量不多，故沒有進行其LD50之測定

二、鎮痛試驗

如圖二所示：(1)熱刺激：獨活之甲醇粗抽取液及其氯仿層、乙酸乙酯層對小白鼠之熱板反應有抑制作用，尤以給藥後50分鐘之作用最爲明顯，而水層則無明顯的效應。(2)化學刺激：如圖三所示，獨活之甲醇粗抽取液及其氯仿層、乙酸乙酯層對小白鼠因注射醋酸至腹腔所引起的腹部扭轉反應有抑制作用，其水層則無明顯的效應。

三、對睡眠時間之影響

如圖四所示，獨活之甲醇粗抽取液和乙酸乙酯層均能縮短由hexobarbital 誘發睡眠的發作時間(onset)，並能延長其睡眠時間(duration)，而氯仿層則僅能延長其睡眠時間(duration)。

四、對中樞神經興奮劑引起痙攣之影響

(1)由Picrotoxin 所誘發產生之痙攣，如圖五所示，獨活之甲醇粗抽取液、氯仿層和乙酸乙酯層對picrotoxin所引起之痙攣有抑制作用(尤其是能延長其痙攣之duration，即能延長小白鼠因痙攣發作而死亡之時間)。

(2)由Strychnine 所誘發產生之痙攣，如圖六所示，獨活之氯仿層及乙酸乙酯層能延長strychnine所致痙攣之duration。

(3)如圖七所示，獨活之甲醇粗抽取液、氯仿層、乙酸乙酯層對pentylenetetrazol引起之痙攣均無抑制作用。

五、對化學物質所致炎症之影響

(1)由Formalin 引起之浮腫，由圖八可知，獨活之氯仿層及乙酸乙酯層對formalin 所引起之足蹠浮腫有抑制作用，尤以乙酸乙酯層之抑制效果更可長達四小時，比較indomethacin之二・五小時持續更久。

(2)由圖九所示，獨活之甲醇粗抽取液、氯仿層及乙酸乙酯層對serotonin 所引起之浮腫均無抑制之效果。而indomethacin亦無法改善由serotonin所致之浮腫。

(3)由圖十所示，獨活之甲醇粗抽取液、氯仿層及乙酸乙酯層在carrageenin 給藥後三・五小時有抑制浮腫之作用，而indomethacin則在二小時即能抑制carrageenin 所致之浮腫。

討 論

獨活(*Angelica pubescens* Maxim.)爲繖形科植物，在臨床上常使用于治療風濕症及鎮痛等方面。本研究乃以獨活之不同溶媒抽取物進行其在中樞神經系統之作用，以了解獨活之作用。

獨活之甲醇粗抽取液、氯仿層和水層，在急性毒性試驗方面可知氯仿層之LD50爲0.85 g/kg；甲醇粗抽取液爲3.9g/kg而水層之LD50則大於64.2g/kg。由此可推測獨活不同溶媒之抽出物，其極性愈大之抽出液，毒性愈小。

首先在鎮痛試驗方面，由結果顯示獨活之甲醇粗抽取液、氯仿層、乙酸乙酯層對熱板反應均有抑制作用，此作用和150mg/kg Aspirin 對熱板反應之抑制作用相比較，甲醇粗抽取液約爲aspirin之4倍，氯仿層則約爲11倍，而乙酸乙酯層約爲5倍。至於在醋酸扭轉反應，甲醇粗抽取液約爲aspirin之0.236倍，氯仿層約爲aspirin之0.212倍，而乙酸乙酯層則約爲0.4倍。

在小白鼠睡眠時間方面，甲醇粗抽取液、氯仿層和乙酸乙酯層均可延長由Hexobarbital 誘發之睡眠時間，但乙酸乙酯層則有較強之作用。此作用是直接對中樞產生抑制作用或是抑制了肝臟對hexobarbital 之代謝，有待進一步之研究。

至於抗痙攣方面，由Picrotoxin 產生之痙攣，甲醇粗抽取液、氯仿層和乙酸乙酯層均有抑制作用；而Picrotoxin主要作用於腦幹(brain stem)，可阻斷突觸前抑制(presynaptic inhibiton)，爲GABA 拮抗劑[9]。而在strychnine 產生之痙攣方面，只有氯仿層和乙酸乙酯層有抑制作用；strychnine對spinal cord有顯著作用，能阻斷突觸後抑制(postsynaptic inhibition)，爲glycine拮抗劑[10]。在pentylenetetrazol 產生之痙攣方面，獨活之甲醇粗抽取液、氯仿層和乙酸乙酯層皆無抑制作用。pentylenetetrazol可直接作用於細胞膜而縮短突觸之乏興奮期[11]，且其主要作用部位係於MRF(mesencephalic reticular formation)，爲GABA之拮抗劑[12]。由實驗結果可知獨活之甲醇粗抽取液、氯仿層和乙酸乙酯層對GABA和glycine之作用仍有所不同，至於其抗痙攣之有效成分及其機轉則有待進一步探討。

在抗炎方面，對serotonin所致之足蹠浮腫，獨活無抑制效果。serotonin(5-hydroxytryptamine)爲一種biogenic amine ，可使血管擴張，並增加血管通透性[13]，獨活對serotonin所致之血管通透性增加並無改善效果。而formalin引起足蹠之發炎，係一種直接的刺激作用，與bradykinin 之分泌有密切之關係[14]，bradykinin爲一種vasodilator ，可促使mast cell釋放histamine和促使kidney釋放prostaglandins[15]。獨活之氯仿層和乙酸乙酯層可抑制formalin所致之浮腫，是否和抑制bradykinin之產生有關，有待進一步實驗證明。而carrageenin爲一種多醣類，經由皮下給藥可誘發產生炎症[16]，由carrageenin所引起之發炎可被aspirin、phenylbutazone 所抑制[17]，而本實驗結果中亦發現indomethacin可明顯抑制carrageenin之浮腫，indomethacin爲NSAID(nonsteroid antiinflammatory drug)其作用和抑制prostaglandins 之產生有關。由此可推論carrageenin所誘發之浮腫可能是經由prostaglandins而來。獨活對carrageenin 浮腫之抑制作用是否和prostaglandins有關，亦需進一步實驗探討之。

由以上結果顯示獨活具有鎮痛、鎮靜、抗痙攣及抗發炎作用，這和本經上所言“主風寒所擊、金瘡止痛、奔豚、癇痓……”[18]，別錄之“治諸風、百節痛風無久新者”[19]等本草之言能祛風、勝濕、散寒、止痛而治風寒濕痺，腰膝酸痛，手脚攣痛等有相同之處。至於獨活之有效成分及其作用機轉，正進一步的探討之中。

謝 辭

本文係國科會贊助之研究計畫(NSC 76-0412-B039-0913)之成果部分，特此致謝。

REFERENCES

1. T. Kosuge, M. Yokata, K. Sugiyama, T. Yamamoto, T. Mure, Y. Kuroki, T. Kose and H. Yamazawa, YAKUGAKU ZASSHI, 105(9), 845 (1985).
2. T. Kosuge, M. Yokota, K. Sugiyama, T. Yamamoto, K. Mure and H. Yamazawa, Chem. Pharm. Bull. 33(12), 5351 (1985).
3. J.T. Litchfield and F. Wilcoxon, J. Pharmacol. Exp. Ther. 96, 99 (1949).
4. G. Woolfe and A.D. Macdonald, J. Pharmacol. Exp. Ther. 80, 300 (1944).
5. B.A. Whittle, Brit. J. Pharmacol., 22, 246 (1964).
6. R.A. Turner, Depressants of the Central Nervous System II. The Righting Reflex. In, Screening Methods in Pharmacology, 2nd. ed. Academic Press, Inc. New York, 70, (1972).
7. R.A. Turner, Anticonvulsants II. Convulsions Induced by Chemicals. In, Screening Methods in Pharmacology, 2nd. ed. Academic Press, Inc. New York, 164, (1972).
8. R.A. Turner, Anti-inflammatory Agents II. Pedal Inflammation Induced by Chemical Agents. In, Screening Methods in Pharmacology, 2nd. ed. Academic Press, Inc. New York, 152, (1972).
9. D.N. Franz, Central Nervous System Stimulants In, The Pharmacological Basis of Therapeutics, 7th ed. (A.G. Gilman, L.S. Goodman, T.W. Rall. F. Murad) Macmillan Publishing Co., Inc. New York, 584 (1985).
10. D.N. Franz, Central Nervous System Stimulants In, The Pharmacological Basis of Therapeutics, 7th ed. (A.G. Gilman, L.S. Goodman, T.W. Rall, F. Murad) Macmillan Publishing Co., Inc. New York, 583 (1985).
11. D.W. Esplin and E.M. Curto, Effects of Trimethadione on synaptic Transmission in Spinal Cord; Antogonism of Trimethadione and Pentylenetetrazol. In, The Pharmacological Basis of Thera peutics, 6th. ed. (A.G. Gilman, L.S. Goodman, A. Gilman, eds) Macmillan Publishing Co., Inc. New York, 588 (1980).
12. F. Velasco, M. Velasco and R. Rome, Clin. Neurophsiol. 56 (5), 521 (1983).
13. W.W. Douuglas, Histamine and 5-Hydroxytryptamine (Serotonin) and Thier Antagonists. In, The Pharmacological Basis of Therapeutics, 7th. ed. (A.G. Goodman, L.S. Goodman, T.W. Rall and F. Murad) Macmillan Publishing Co., Inc. New York, 630 (1985).
14. 蔡輝彥：藥理學實驗，51，1988，中國醫藥學院藥理學科印行。
15. 蔡輝彥：實用藥理學，44-10，1987，協進圖書有限公司印行。
16. W. Robertson, B. Van and B. Schwartz, J. Biol. Chem. 201, 689 (1953).
17. C.A. Winter, E. Risley and G.W. Nuss, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. III, 544 (1962).

18. 南北朝：陶弘景：集注神農本草經（小島尙眞，森立之　重輯），卷三，46，1972，橫田書局，大阪。
19. 那琦：謝文全：重輯名醫別錄，中國醫藥學院　中國藥學研究所刊行，43，1977。

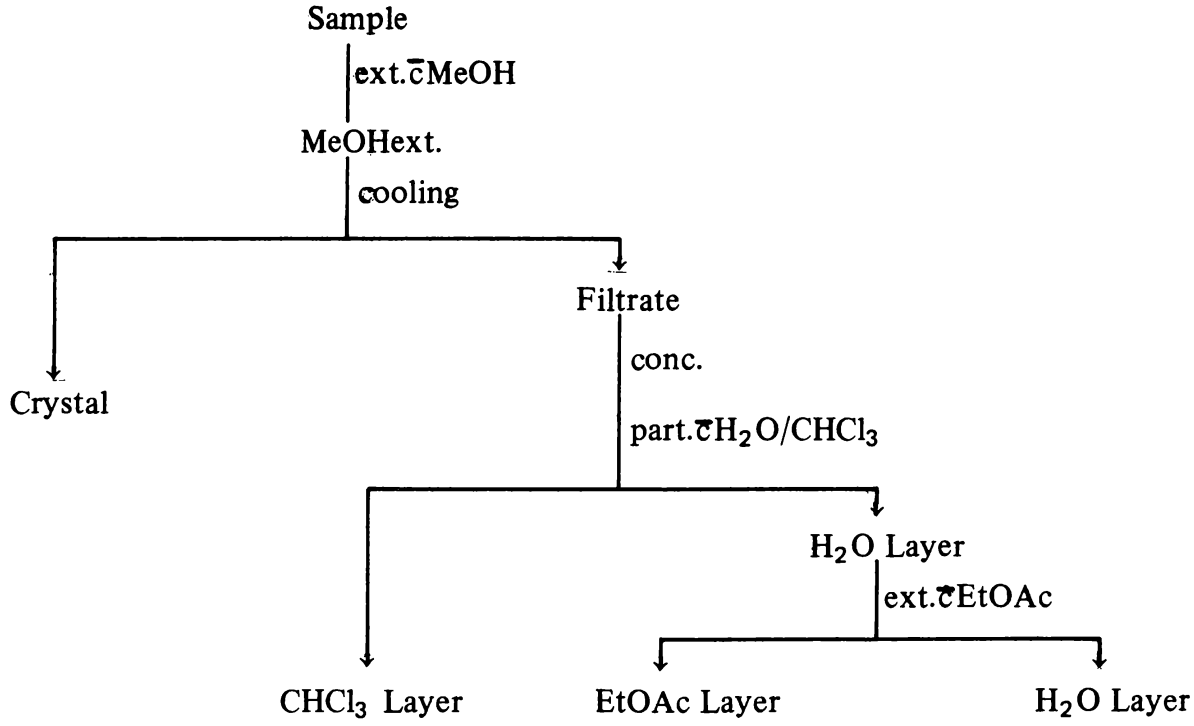

Figure 1. Isolation procedure for crude extracts from *Angelica pubescens* MAXIM. (AP).

Table 1. LD 50 and 95% confidence limits of various AP extracts.

	Route of Admistration	LD 50g/kg	95% confidence limits g/kg
MeOH	P.O.	3.9	3.15 – 4.84
H_2O	P.O.	>64.2	–
$CHCl_3$	P.O.	0.845	0.754 – 0.946

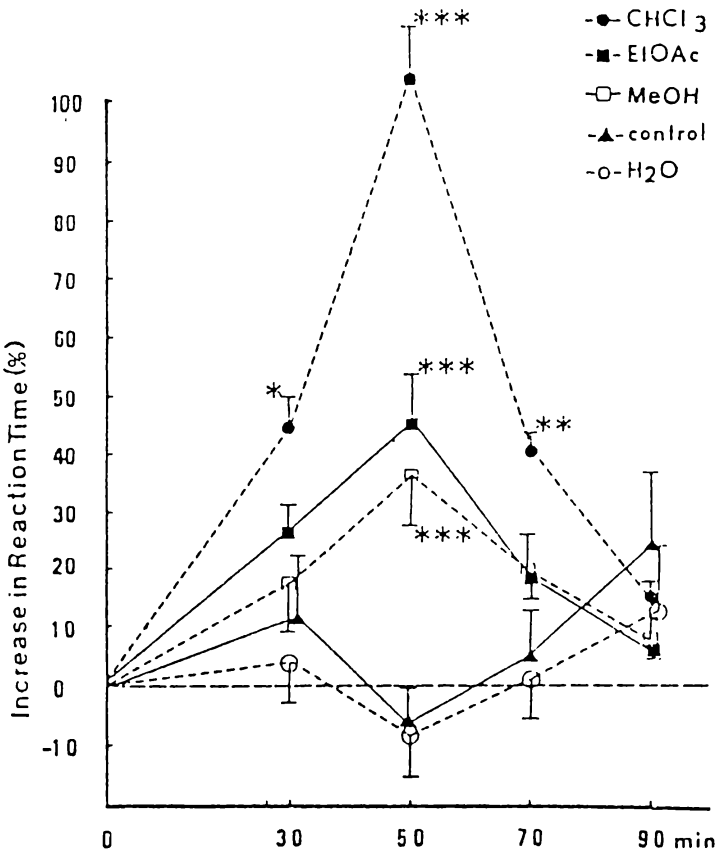

Figure 2. Analgesic effects of various AP extracts on thermal induced pain in mice.
*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 (Compared with control).

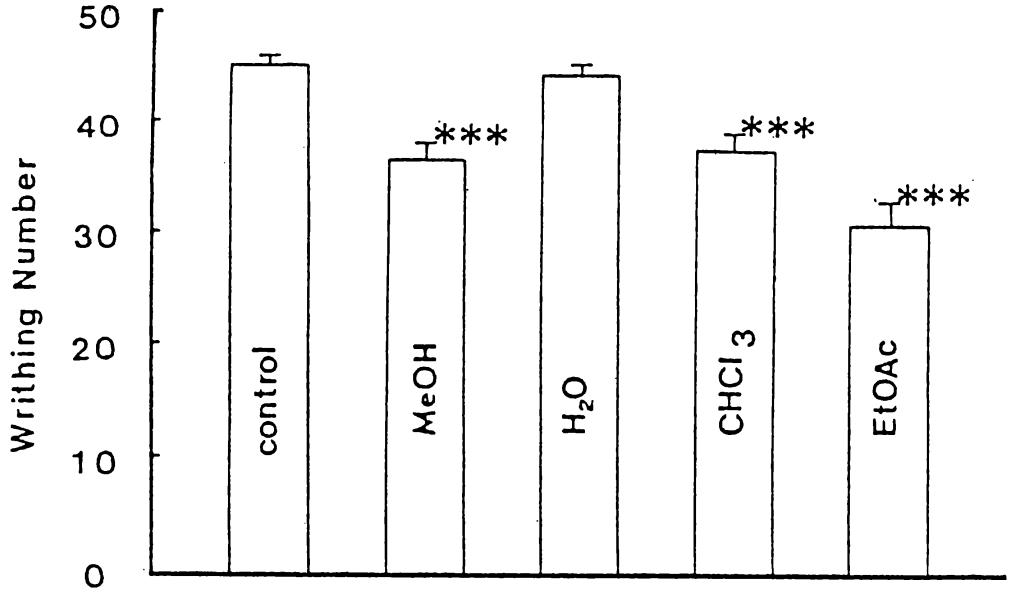

Figure 3. Analgesic effects of various AP extracts on acetic acid induced writhing symptom in mice. ***P < 0.001 (Compared with control).

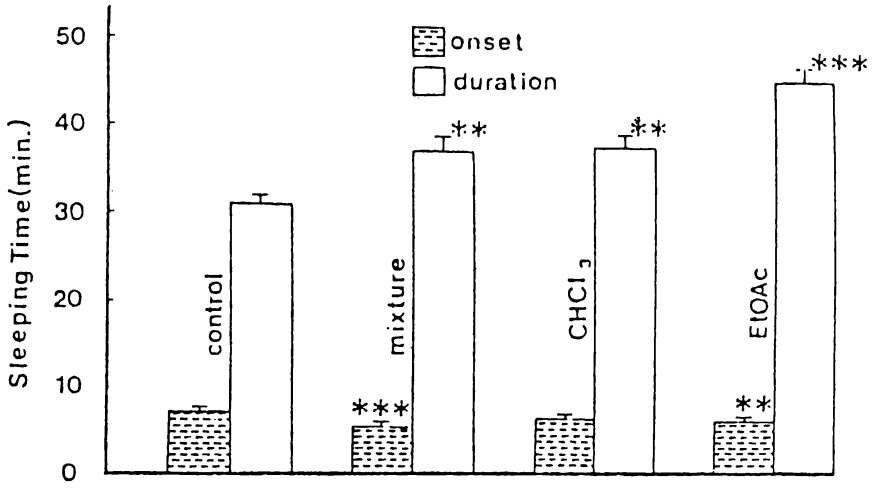

Figure 4. Effects of various AP extracts on hexobarbital induced hypnosis in mice. **P < 0.01, ***P < 0.001 (Compared with control).

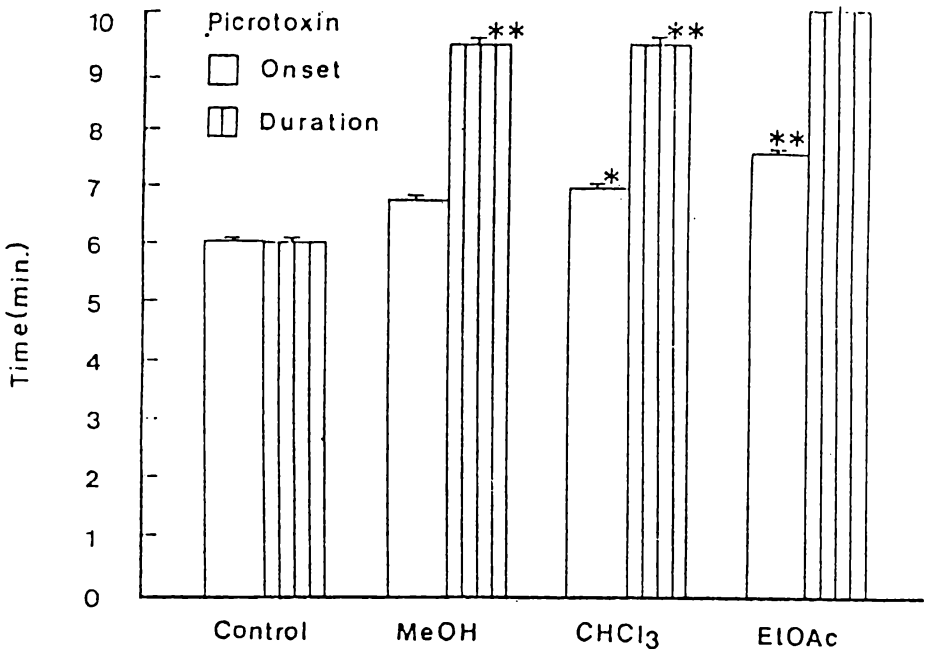

Figure 5. Effects of various AP extracts on the picrotoxin induced convulsion in mice. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 (Compared with control).

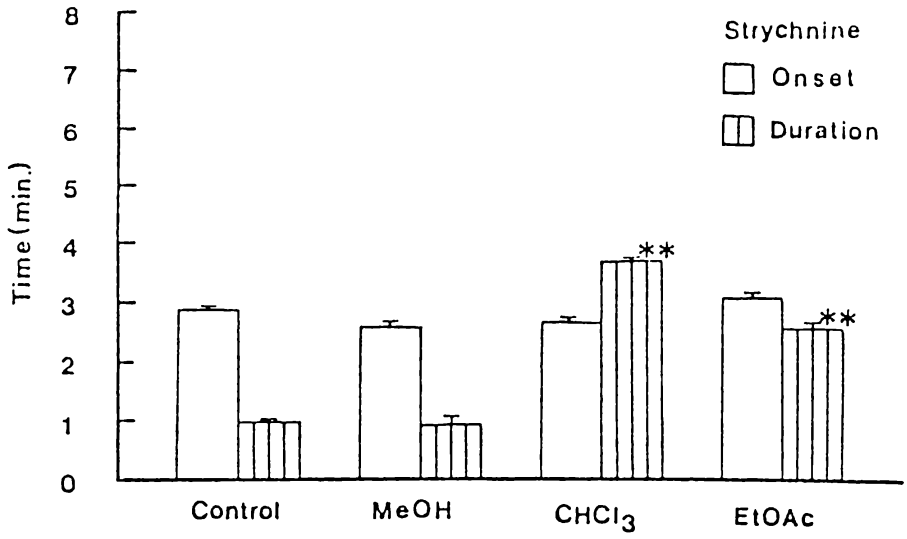

Figure 6. Effects of various AP extracts on the strychnine induced convulsion in mice. **P < 0.01 (Compared with control).

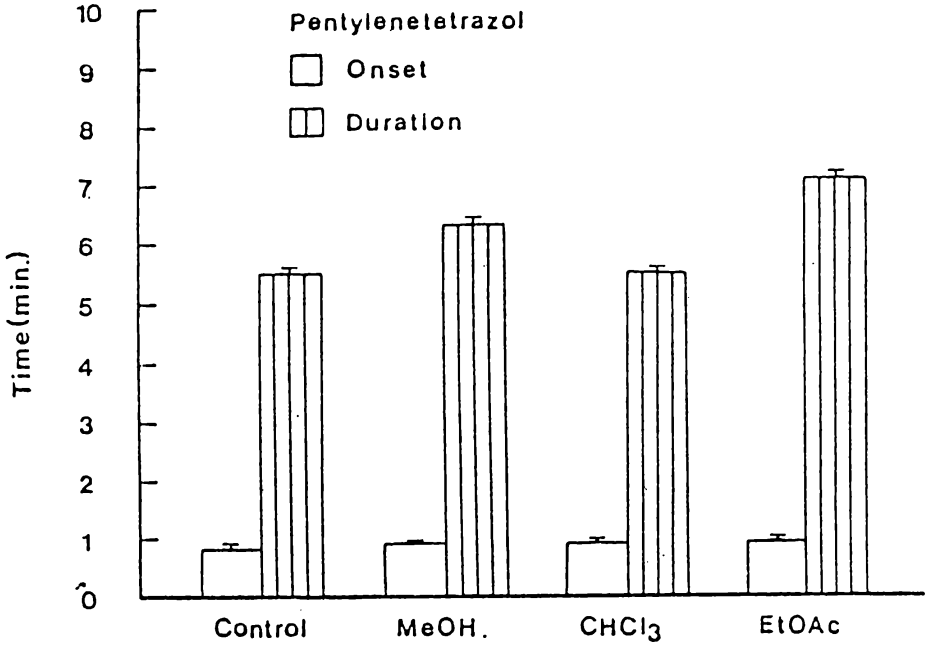

Figure 7. Effects of various AP extracts on the penetylene-tetrazol induced convulsion in mice.

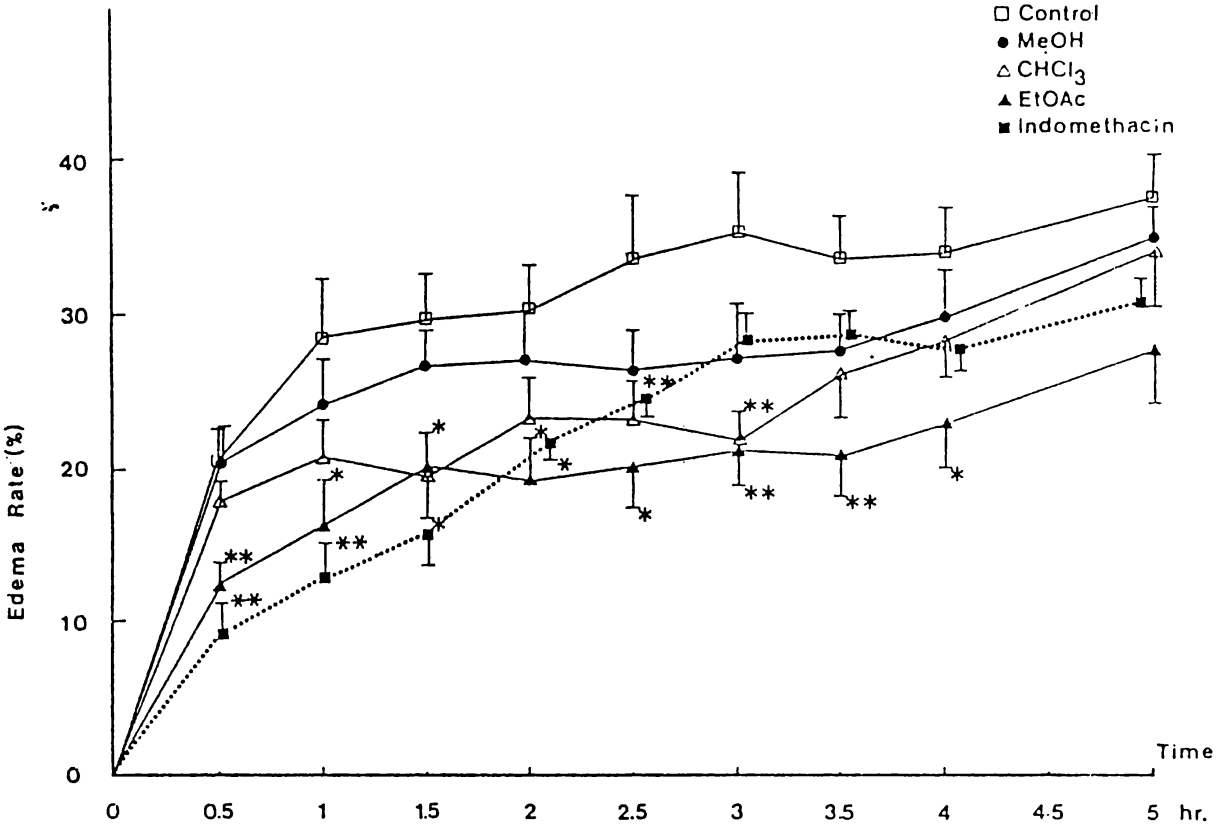

Figure 8. Antiinflammatory activities of various AP extracts on 3% formalin induced-edema in rat. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 (Compared with control).

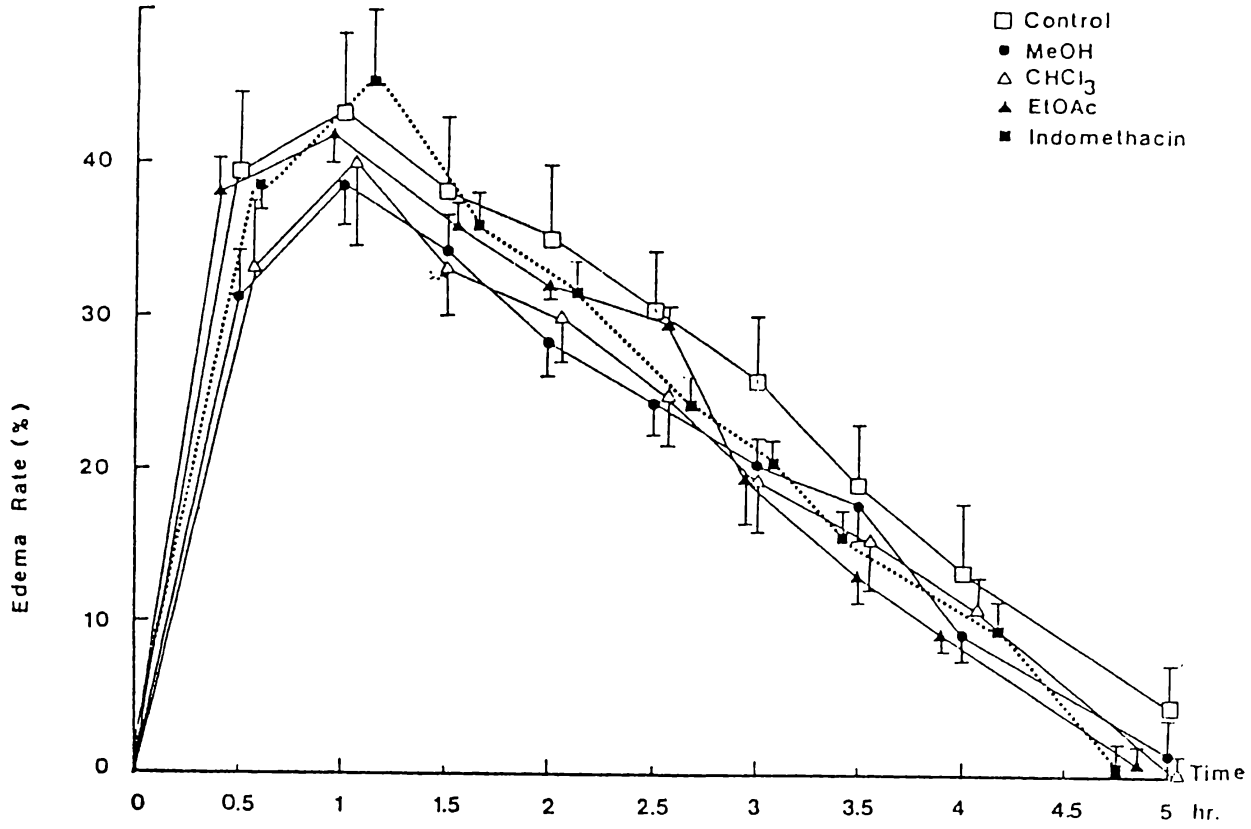

Figure 9. Antiinflammatory activities of various AP extracts on 0.1% serotonin induced-edema in rat.

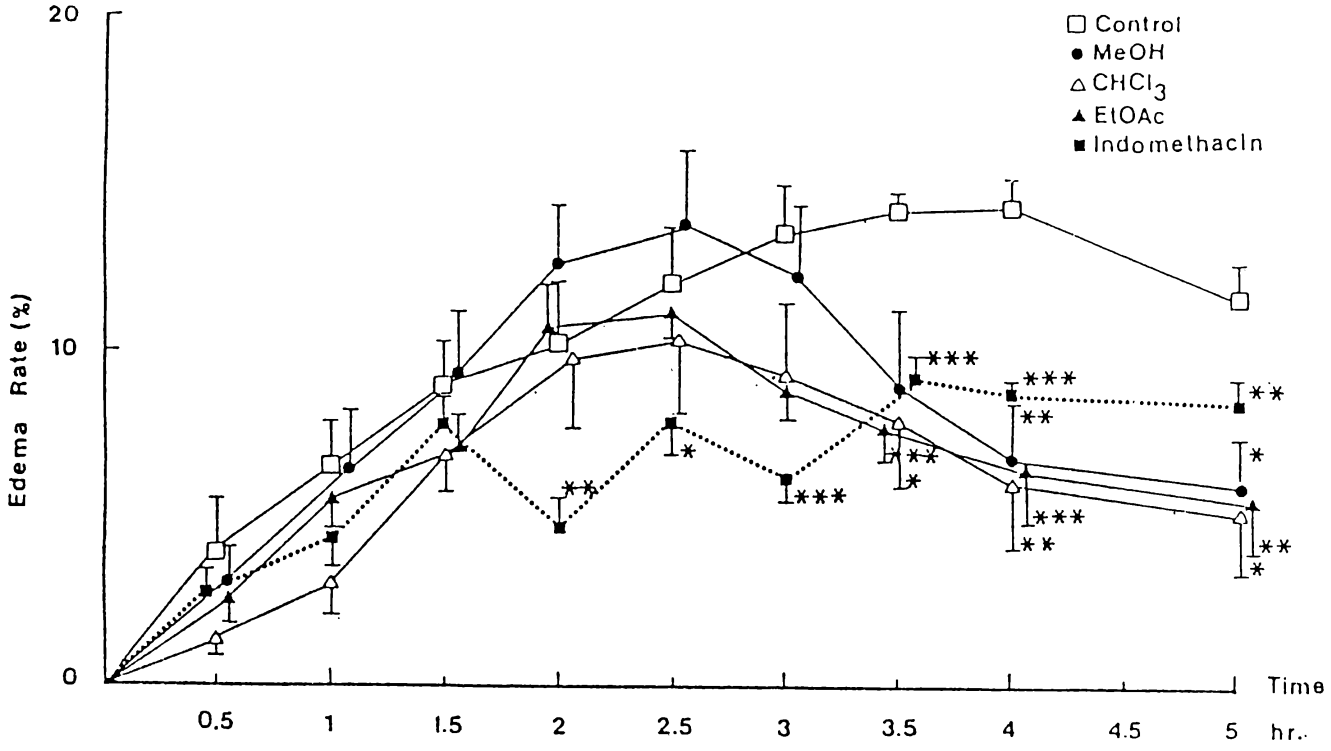

Figure 10. Antiinflammatory activities of various AP extracts on 1.5% carrageenin induced-edema in rat. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 (Compared with control).

STUDIES OF THE CRUDE EXTRACTS OF ANGELICA PUBESCENS ON THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM

*Huei-Yann Tsai, Yuh-Fung Chen, Tian-Shung Wu**, Ming-Tsuen Hsieh* and Jeng-Shiow Lai***

*Department of Pharmacology, *Institute of Chinese Pharmaceutical Sciences, China Medical College,*
***Institute of Applied Chemistry, Providence College of Arts and Sciences*

Angelica pubescens MAXIM. is used by Chinese physicians in rheumatism, analgesia. This study is intended to investigate its effects on the central nervous system, to isolate the active constituents, and to assay their biological activity. The following results were obtained.

1. LD 50 by the oral route in mice: Methanol-extract 3.9 (3.15–4.84)g/kg; chloroform-extract 0.85 (0.75–0.95)g/kg; water-extract $>$ 64.2g/kg.
2. Analgesic effects: The methanol-, chloroform-, and ethylacetate-extracts can inhibit the writhing response and hot plate response in mice. The water-extract has no apparent analgesic effects.
3. Hypnotic effects: The methanol-, chloroform-, and ethylacetate-extracts can prolong the sleeping time in mice.
4. Anticonvulsive effects: The methanol-extract can inhibit the convulsion induced by picrotoxin but can not inhibit the convulsions induced by strychnine and metrazol. The chloroform- and ethylacetate-extracts can inhibit the convulsions induced by strychnine and picrotoxin but can not inhibit the convulsion induced by metrazol.
5. Anti-inflammatory effects: The methanol-extract can inhibit the inflammation induced by carrageenin. The chloroform- and ethylacetate-extracts can inhibit the inflammation induced by formalin and carrageenin.

In conclusion, the methanol-, chloroform-, and ethylacetate-extracts had analgesic, antiimflammatory, hypnotic and anticonvulsive effects.